

银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用比较

韩 鹏, 邱 凌, 黄 浩, 陈祥仁, 陈清西*

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 报道银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶活力的影响. 结果表明: 银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶活力均有显著的抑制作用. 测定导致酶活力下降 50% 的银杏叶和银杏外种皮提取物含量 (IC_{50}) 分别为: 6.59 mg/mL 和 2.73 mg/mL. 对酪氨酸酶的抑制作用均表现为可逆抑制, 抑制类型均为混合型. 分别测定银杏叶和外种皮提取物对游离酶抑制常数 (K_i) 和酶-底物络合物抑制常数 (K_{is}), 并加以比较.

关键词: 银杏叶; 银杏外种皮; 乙醇提取物; 酪氨酸酶; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)Sup-0116-04

酪氨酸酶 (EC. 1.14.18.1) 是一种含铜的多酚氧化酶, 是生物体合成黑色素等而产生色斑的关键酶. 它先将酪氨酸羟化, 产生邻位二羟基苯丙氨酸 (L-多巴), 然后再将多巴氧化成多巴醌, 进而生成一系列引起褐化的色素物. 由于色素障碍性疾病、恶性黑色素瘤、白化病和老年性痴呆的发生与治疗, 均与酪氨酸酶直接相关, 国内外对该酶的研究主要集中在医药方面^[1]. 对于该酶抑制剂的研究, 国内研究较少且不够深入, 主要是一些用于皮肤保健和治疗的常规抑制剂的研究^[2]. 在国外, 美国加州 Berkeley 大学的 Kubo 教授带领的研究人员从天然植物 (茜苳、腰果等) 中提取了一系列该酶的抑制剂, 经检测主要为黄酮类天然产物, 测定了它们对蘑菇酪氨酸酶的效应机理^[3].

银杏 (*Ginkgo biloba*), 为银杏科, 银杏属植物, 是世界上珍贵的药用植物, 其叶和外种皮等皆具有药用开发价值, 被称为“全身都是宝的活化石”, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、免疫、延缓衰老、防治心脑血管疾病等功效. 银杏叶中主要的化学成分为黄酮类、内酯类化合物等^[4]. 银杏外种皮中主要的化学成分为银杏酸、银杏酚、多糖糖甙类化合物等^[4]. 黄酮类化合物具有极强的清除自由基能力和抗氧化性能^[5]. 银杏酸可抑制多种真菌和细菌^[6], 并有抑制透明质酸酶和酪氨酸酶的活性, 具有增白皮肤的效果^[7]. 本文报道银杏叶和银杏

外种皮乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用及其作用机理, 提出抑制剂和酶分子间结合作用的分子模型, 从酶学角度探讨银杏叶和外种皮的药效机理.

1 材料与方法

1.1 实验材料

银杏叶采后风干, 经加工、烘制成粉末状干品备用; 银杏外种皮收集后, 烘干备用. 蘑菇酪氨酸酶为 Sigma 化学公司产品, 比活力为 6 680 U/mg; L-多巴 (L-DOPA) 为 Sigma 产品; 其它试剂均为国产分析纯. 实验用水为玻璃重蒸水.

1.2 样品制备

取银杏叶粉末 5.00 g, 加入 100 mL 50% 乙醇, 超声波萃取, 过滤. 滤液经旋转蒸发至呈膏状, 取 0.5 mg 膏状物, 加 5 mL 蒸馏水溶解, 低速离心 10 min, 上清液即为银杏叶乙醇提取物, 用于测定对酪氨酸酶的效应. 同样方法, 制得银杏外种皮乙醇提取物.

1.3 银杏乙醇提取物对酪氨酸酶活力的影响

酪氨酸酶的酶活力测定参考文献 [8]. 先加入 0.1 mL 含不同含量的样品提取物于比色杯中, 再加进 2.8 mL 预先在 30 °C 恒温水浴保温的底物溶液, 然后加入 0.1 mL 酪氨酸酶水溶液, 即刻充分混匀, 在 30 °C 恒温条件下测定波长为 475 nm 的光密度值, 由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力, 消光系数按 3 700 ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) 计算^[9]. 底物 (L-DOPA) 的终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 酶的终浓度为 6.67 $\mu\text{g/mL}$. 测定仪器 UV-650 分光光度计. 样品的抑制强度以导致酶活力下降 50% 所需的抑制剂含量 (IC_{50}) 表示.

收稿日期: 2005-02-24

基金项目: 福建省科技攻关课题 (2004N002), 福建省自然科学基金 (B0410003) 资助

作者简介: 韩鹏 (1980-), 女, 硕士研究生.

* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

1.4 银杏乙醇提取物对酪氨酸酶抑制作用机理

在含不同含量的银杏乙醇提取物的测活体系中, 加入不同浓度的酪氨酸酶, 测定酶活力与酶浓度的关系, 通过作图法判断抑制剂的作用机理.

1.5 银杏乙醇提取物对酪氨酸酶抑制类型与抑制常数的测定

银杏乙醇提取物对酪氨酸酶抑制作用类型的测定采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图判断, 抑制常数通过直线的斜率和纵轴截距对效应物含量二次作图测定.

2 实验结果

2.1 银杏叶和外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶活力的影响

酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化不存在迟滞过程, 在反应体系中加入不同量的银杏乙醇提取物后, 酶作用的进行曲线为一组斜率随着加入的银杏提取物量的增大而下降的直线关系(图略), 说明银杏提取物对酪氨酸酶活力有抑制作用. 银杏提取物对酪氨酸酶活力的浓度效应试验结果见图 1. 分别测定银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物导致酶活力下降一半所需的抑制剂含量(IC_{50}) 分别为 6.59 mg/mL 和 2.73 mg/mL. 实验结果表明, 银杏外种皮对酪氨酸酶抑制较强.

2.2 银杏叶和外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用机理

研究银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制效应. 在固定底物(L-DOPA) 浓度的测活体系

中, 改变加入的酶蛋白的量, 测定不同含量效应物对酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响. 图 2 表示酪氨酸酶经银杏叶乙醇提取物作用后的剩余酶活力与加入的酶量间的关系, 得到一组通过原点的直线. 随着加入的银杏叶乙醇提取物的增大, 直线的斜率逐渐下降, 说明银杏叶乙醇提取物对该酶的抑制作用均属于可逆过程, 增加效应物含量导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制, 催化效率降低. 而不是通过导致有效的酶量减少而引起酶活力的下降. 因为不可逆的抑制剂将会导致有效酶量下降而产生一组平行线, 横轴的截距将随着不可逆抑制剂含量的增大而增大. 同样的实验, 以银杏外种皮的乙醇提取物为效应物, 具有相同的作用机理, 也属于可逆的抑制作用.

2.3 银杏乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制类型及抑制常数的测定

研究银杏的乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制作用类型, 在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变 L-DOPA 浓度, 测定不同含量抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断抑制剂的抑制类型. 实验结果表明, 从银杏叶和银杏外种皮的乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶具有相同的抑制作用机理, Lineweaver-Burk 双倒数作图均为一组相交于第二象限的一组直线, 说明银杏提取物作为酪氨酸酶抑制剂, 可以改变酶促反应的最大反应速度(V_m) 和米氏常数(K_m), 其抑制类型为混合型. 图 3 为银杏叶提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图, K_m 值随着效应物含量的增大而增大, V_m 随着效应物含量增大而下降, 表明银杏叶提取物即影响酶对底物的亲和力也

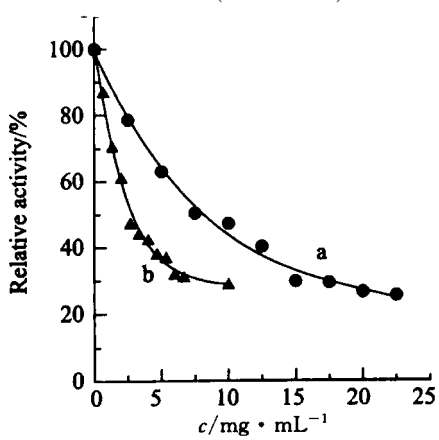


图 1 银杏叶乙醇提取物 (a) 和银杏外种皮乙醇提取物 (b) 对酪氨酸酶活力的影响

Fig.1 Effects of the extracts with ethanol from the leaves (a) and the sarcotesta (b) of *Ginkgo biloba* on the activity of mushroom tyrosinase

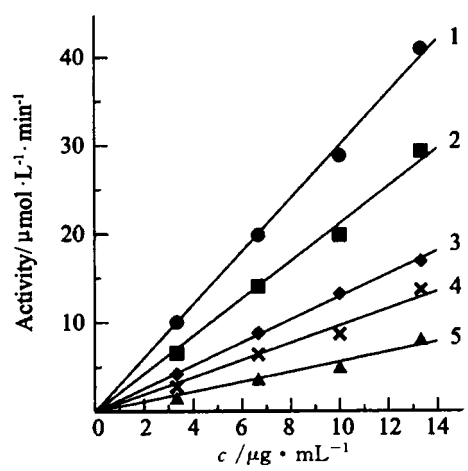


图 2 银杏叶乙醇提取物对酪氨酸酶抑制机理
1~5 提取物浓度分别为 0、5、10、15 和 20 mg/mL

Fig.2 Determination of the inhibitory mechanism of the extract with ethanol from the leaves of *Ginkgo biloba* on mushroom tyrosinase

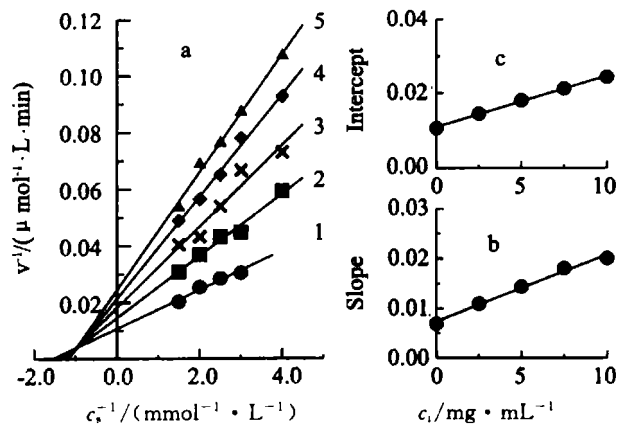


图3 银杏叶乙醇提取物对酪氨酸酶抑制作用
直线 1~ 5 提取物浓度分别为 2.5、5.0、7.5 和 10 mg/mL

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for the inhibition of the extract with ethanol from the leaves of *Ginkgo biloba* on mushroom tyrosinase

影响酶的催化作用,该提取物即能与游离酶(E)结合,也能与酶-底物络合物(ES)结合,但抑制作用强度不同.分别以双倒数直线的斜率和纵轴截距对效应物含量二次作图,以斜率(图3b)和纵轴截距(图3c)对提取物含量作图为直线,分别可以求出效应物对游离酶抑制常数(K_i)和对酶-底物络合物抑制常数(K_{is}).测定结果见表1.银杏外种皮的乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶也有类似的作用.相同的方法也测定出效应物对游离酶抑制常数(K_i)和对酶-底物络合物抑制常数(K_{is}).测定结果总结表1,供比较.

3 讨论

银杏作为古代二叠纪遗植物,在传统中成药的研制中,具有极高的药用价值.中国是盛产银杏的国

家,但对银杏资源的开发程度却远远落后于国外.在德国,早有人研制银杏制剂治疗各种心脑血管疾病.近代研究^[10]表明,银杏能降血脂、降低胆固醇、降低血粘度、改善心脑血管循环,对于治疗高血压、脑血栓、心肌梗塞及老年痴呆症等,疗效显著.我们的研究进一步证明银杏的乙醇提取物除了上述药效外,能够显著地抑制蘑菇酪氨酸酶的活力.近几年的研究主要集中在银杏叶的成分及药用分析,较少涉及酶学领域的探讨,尤其是对银杏外种皮的研究.有报道指出,银杏叶及外种皮中含有酚酸性成分,若作为生物农药,具有良好的杀虫效果^[11].但是对于其杀虫机理的阐明,尚不够深入.蘑菇酪氨酸酶与昆虫多酚氧化酶有较高的同源性,我们认为,可能是由于银杏叶及外种皮中的黄酮类和酚酸类成分,作为昆虫体内多酚氧化酶(即酪氨酸酶)的底物类似物,有效地破坏了多酚氧化酶的作用,从而干扰到昆虫正常的生理功能,达到杀虫的目的,其作用机理有待进一步证实.

比较了银杏叶和银杏外种皮的乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶活力的影响,发现银杏叶和银杏外种皮乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶均有抑制作用,其中银杏外种皮的乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用最强,其原因是银杏外种皮中酚酸性成分高于银杏叶.银杏酸是银杏提取物中的毒性成分,实验表明,银杏酚酸除了抑菌、杀菌、杀虫、抗肿瘤、致敏等作用^[12]外,对于酪氨酸酶,亦有抑制作用.从理论上阐明了银杏提取物抑制酪氨酸酶活性的机理,为寻找新型的酪氨酸酶抑制剂研究提供了理论依据.银杏外种皮是采摘银杏果后遗留的废弃物,不仅污染环境,而且其酚酸性成分对人体皮肤亦有一定程度的伤害.若能对银杏外种皮妥善加以利用,研制新型的酪氨酸酶抑制剂和生物杀虫剂,则能变废为宝,具有理论和实际应用的价值.

表1 银杏叶和外种皮乙醇提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制常数

Tab. 1 Inhibition constants of extracts by the ethanol from *Ginkgo biloba* leaves and from *Ginkgo biloba* sarcotesta on mushroom tyrosinase

样品	$IC_{50}/(mg \cdot mL^{-1})$	抑制类型	抑制常数/ $(mg \cdot mL^{-1})$	
			K_i	K_{is}
银杏叶提取物	6.59	混合型	5.63	7.59
银杏外种皮提取物	2.73	混合型	1.97	5.64

参考文献:

- [1] Xu Y, Stokes A H, Freeman W M, et al. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra[J]. Mol. Brain Res., 1997, 45: 159– 162.
- [2] 高秀蕊, 石双群, 宋秀芹. 某些药物对酪氨酸酶的抑制和对氧自由基的清除[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(1): 70– 71.
- [3] Kubo I, Kinst-Hori I, Isiguro K, et al. T. Flavonols from *H. inuloides*. tyrosinase inhibitory activity and structural criteria[J]. Bioorg. Med. Chem., 2000, 8: 1 585– 1 591.
- [4] 陆惠娴. 银杏的研究进展[J]. 基层中药杂志, 1997, 11(4): 49– 51.
- [5] 王奎兰, 黎碧娜, 叶凯贞, 等. 银杏叶中有效成分的提取及其应用[J]. 日用化学工业, 2004, 34(3): 170– 172.
- [6] 杨小明, 陈钧钱, 郭涛. 银杏酸抑菌效果的初步研究[J]. 中药材, 2002, 25(9): 651– 653.
- [7] Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y, et al. Tyrosinase inhibitors from anacardium occidentale fruits[J]. Journal of Natural Products, 1994, 57(4): 545– 548.
- [8] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491– 496.
- [9] 黄璜, 刘晓丹, 陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 98– 101.
- [10] 刘玲玲, 于心若. 银杏药用价值[J]. 中草药, 1994, 25(4): 219– 221.
- [11] 石启田. 银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 83– 86.
- [12] 仰榴青, 吴向阳, 吴静波, 等. 银杏外种皮的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 111– 115.

The Comparison of Inhibition of Ethanol Extracts of Leaves and Sarcotesta from *Ginkgo biolaba* on Mushroom Tyrosinase

HAN Peng, QIU Ling, HUANG Hao, CHEN Xiang-ren, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Ginkgo biolaba* is a kind of medicinal plant. It has the function of antioxidation, anticancer, antifungal, immunity and so on. In this paper, the ethanol extracts from *Ginkgo biolaba* leaf and *Ginkgo biolaba* sarcotesta were used to test the inhibition on the activity of mushroom tyrosinase. The results showed that ethanol extracts from *Ginkgo biolaba* leaf and *Ginkgo biolaba* sarcotesta could inhibit the activity of tyrosinase obviously. The inhibitor concentration leading to 50% enzyme activity lost, IC_{50} , was estimated to be 6.59 and 2.73 mg/mL, respectively. Their inhibition mechanism was analyzed and the results showed that the ethanol extracts from *Ginkgo biolaba* leaf and *Ginkgo biolaba* sarcotesta were reversibly inhibitors to tyrosinase and the inhibition belonged to the mixed-type. The inhibition constants, K_I and K_{IS} , of each extracts were determined respectively and compared. The inhibition of the ethanol extracts from *Ginkgo biolaba* leaf on tyrosinase is more potent than that from *Ginkgo biolaba* sarcotesta.

Key words: *Ginkgo biolaba* leaf; sarcotesta; ethanol extracts; tyrosinase; inhibition kinetics